

ВНУТРИВЕННОЕ ВВЕДЕНИЕ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КРЫСАМ С АЛКОГОЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

А.Ю. Петренко¹, Г.А. Ковалёв²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина

²Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина

РЕЗЮМЕ

Исследовали действие криоконсервированных клеток эмбриональной печени (КЭП) на модели алкогольного поражения печени (АПП) у крыс. Показано, что внутривенное введение КЭП улучшает общее состояние организма (увеличивает прирост массы тела, улучшает состояние шерсти) и восстанавливает функциональное состояние печени (нормализует продолжительность гексеналового сна и протромбинового времени, повышает содержание альбумина в плазме крови). Указанные результаты, получены на фоне продолжающегося приёма алкоголя.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эмбриональные клетки печени, криоконсервирование, внутривенное введение, алкогольное поражение печени, модель, крысы

Ещё несколько лет назад проблемой применения стволовых клеток (СК) всерьёз интересовались немногие биологи и врачи, а теперь СК – символ новой медицины XXI века [9]. Сегодня мало кто не знает о регенеративно-пластической или клеточной терапии, основанной на применении СК. Её появление позволило совершенно по-новому взглянуть на терапевтические концепции при широком круге заболеваний, вывело их разработку на качественно новый уровень [8, 10, 14]. Однако отношение к этому направлению в практической медицине не однозначно. По мнению [3] государственные и общественные институты оказались явно не готовыми к скорости перехода СК из чашек Петри в системы для внутривенного введения [3]. С одной стороны притягивает огромный потенциал стволовых клеток, дающий надежду на принципиально новый уровень лечения, а с другой – существует здоровая настороженность, поскольку прежде чем говорить о внедрении какого-либо нового терапевтического подхода в клиническую практику, он должен быть подвергнут всестороннему изучению. Эксперименты по трансплантации тотипотентных СК дали отрицательные результаты – возникновение у подопытных животных тератокарцином. Поэтому в настоящее время с терапевтическими целями применяются более продвинутые СК [16, 20]. Одним из наиболее богатых источников таких клеток являются эмбриональные органы и ткани [1, 12, 18], в частности печень. Исходя из вышесказанного, изучение свойств и механизмов действия КЭП является крайне актуальной областью исследования в современной биологии и медицине.

Одним из важнейших и обязательных

этапов исследований свойств КЭП является изучение их действия *in vivo*. С этой целью используются различные экспериментальные модели, дающие возможность воспроизводить ту или иную патологию человека на подопытных животных. Большинство последних экспериментальных исследований посвящённых изучению эффективности и механизмов действия КЭП выполнены либо на модели регенерации печени [4, 11, 19], либо на модели её цирротического перерождения [1, 3, 5].

Учитывая широкую распространённость и доступность спиртных напитков, и беря во внимание тот факт, что регулярное чрезмерное употребление этанола является главной причиной, приводящей к развитию терминальных стадий заболеваний печени [13], выяснение влияния КЭП при патологии печени алкогольного генеза представляется крайне важным. При этом анализ научных публикаций показывает явную нехватку экспериментальных данных о влиянии КЭП в условиях АПП.

Цель работы – изучение действия внутривенного введения криоконсервированных КЭП на модели АПП у крыс.

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины: №7 «Изучение морфо-функциональных особенностей регионарных стволовых клеток эмбрионов их криочувствительности и механизмов реализации биологической активности в условиях культивирования и на моделях некоторых патологических состояний», № госрегистрации 0102U002026.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполняли на 3-х месячных самках белых беспородных крыс (n=36). Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, Франция, 1985). Моделирование АПП проводили в три этапа [2]:

1 – отбор животных, склонных к алкоголизации;

2 – привыкание животных к алкоголю;

3 – интенсивная алкоголизация. На этом этапе вместо обычной диеты крысы получали 96% раствор этанола на стандартных кусочках белого хлеба, два раза в неделю – побеги овса. Потребляемая каждым животным доза алкоголя составляла 14-18 г/кг массы тела в сутки. После развития АПП крысы продолжали получать алкоголь в виде 15% раствора этанола как единственного источника жидкости.

Эмбрионы человека 9-12 недель гестации были получены в результате планового прерывания беременности после письменного разрешения донора. Все эмбриональные клетки выделяли неферментативным методом и криоконсервировали, под защитой 5% ДМСО по трёхэтапной программе замораживания, включающей охлаждение до -40°C со скоростью 1°C/ мин; от -40 до -80°C со скоростью 10°C/мин и погружение в жидкий азот. Пробы отогревали на водяной бане при 40°C непосредственно перед внутривенным введением.

Были сформированы следующие группы (n=9):

1 – интактные животные;

2 – крысы после формирования АПП;

3 – внутривенное введение криозащитной

среды (КЗС), 0,3 мл/100 г массы тела;

4 – введение криоконсервированных КЭП (10⁷ клеток/0,3мл КЗС на 100 г массы тела).

В качестве исследуемых параметров были выбраны показатели общего состояния организма (масса тела, состояние шерсти), и функционального состояния печени (продолжительность гексеналового сна, протромбиновое время, содержание альбумина в плазме крови).

Для оценки состояния шерсти применялась пятиуровневая шкала [7]:

- первый – блестящая, лоснящаяся шерсть, волосы не выпадают, не ломаются;
- второй – шерсть тусклая, без выпадения и ломкости волос;
- третий – шерсть тусклая, ломкая, умеренно выраженное выпадение волос;
- четвёртый – шерсть тусклая, ломкая, выраженное выпадение волос;
- пятый – шерсть тусклая, ломкая, наблюдается выраженное выпадение волос, присутствует гнездовая алопеция (одиночные или множественные очаги).

Оценка действия КЭП производилась спустя семь дней после внутривенного введения.

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи компьютерного пакета программ «Statistica v.5.5» с использованием U критерия Манна-Уитни (P<0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Масса тела интактных животных составляла 221,1±5,7 г, животных после развития АПП – 146,0±4,5, после введения КЗС – 144,0±4,2 (рис. 1.). По сравнению с предыдущей группой внутривенное введение КЭП приводило к увеличению массы тела в 1,4 раза (166,7±4,7).

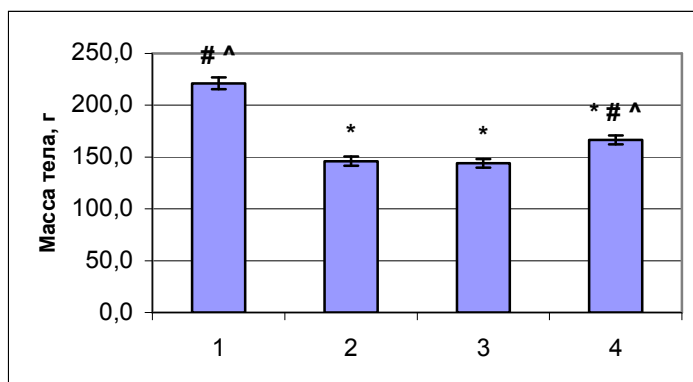


Рис. 1. Изменение массы тела животных: 1 – интактные животные, 2 – крысы после формирования АПП, 3 – КЗС, 4 – КЭП.

* - $P < 0,05$ по отношению к интактным животным, # - $P < 0,05$ по отношению к животным после развития АПП,

^ - $P < 0,05$ по отношению к животным, которым вводили КЗС.

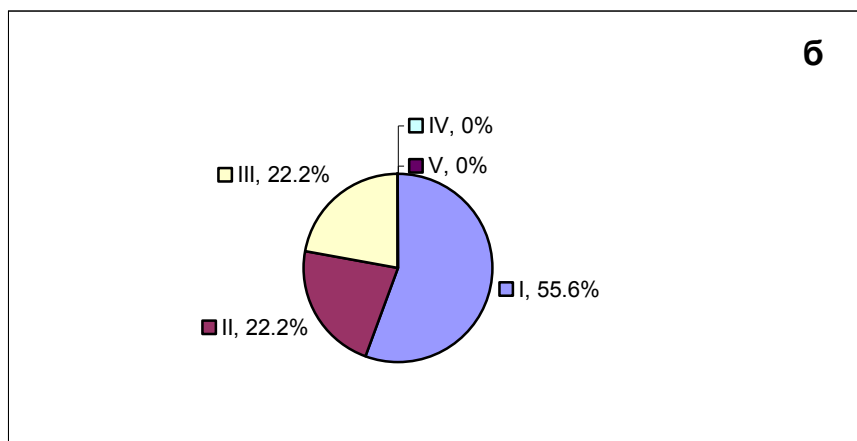
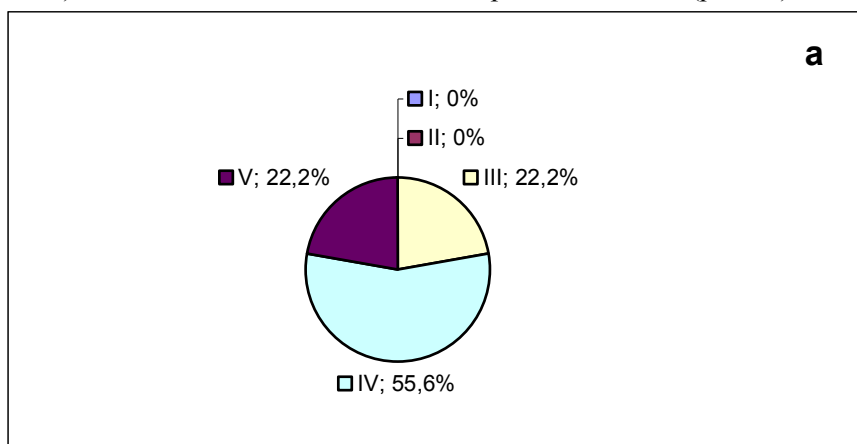
По состоянию шерсти крысы распределялись следующим образом:

- I категория (шерсть без признаков патологии) – все животные в интактной группе, 5 животных в группе с КЭП;
- II категория (шерсть тусклая, выпадения и ломкости волос нет) – 1 животное в КЗС-группе и 2 – в группе с КЭП;
- III категория (шерсть ломкая, выпадение волос выражено умеренно) – 2 животных после

формирования АПП, 3 животных в КЗС-группе, 2 – в группе с КЭП;

- IV категория (наблюдается выраженное выпадение волос) – 5 животных после формирования АПП, 5 животных в КЗС-группе;
- V категория (имеются выраженное выпадение волос, гнездная алопеция) – 2 животных после формирования АПП.

Таким образом, КЭП приводили к значительному улучшению состояния шерсти животных (рис. 2.).



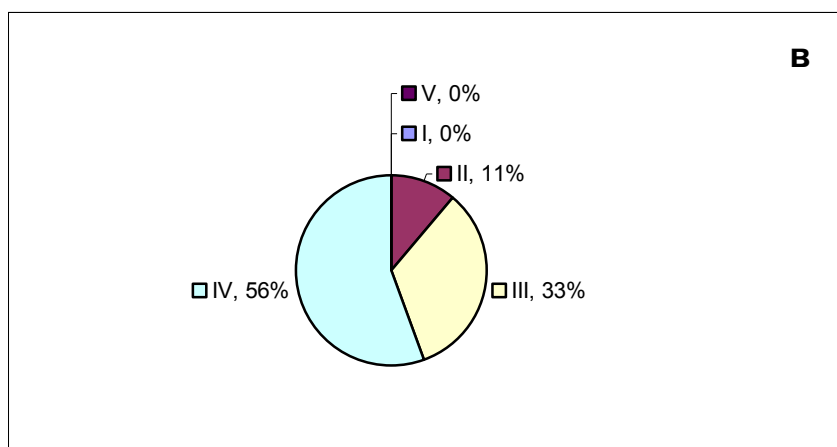


Рис. 2. Распределение животных по категориям состояния шерсти: а – крысы после формирования АПП, б – КЭП, в – КЗС.

Продолжительность гексеналового сна intactных животных составляла $8,0 \pm 0,4$ мин, после развития АПП – $28,4 \pm 0,9$. Внутривенное введение КЭП уменьшало продолжительность гексеналового сна до $9,5 \pm 0,5$, что в 3,8 раза меньше значений в КЗС-группе ($36,4 \pm 1,1$) и не отличается от показателей в intactной группе (рис. 3.).

Протромбиновое время у intactных животных составляло $25,2 \pm 0,4$ с, после развития поражения печени – $51,1 \pm 1,6$ (рис. 4.). По сравнению с КЗС-группой, применение КЭП снижало этот показатель в

1,9 раза ($45,1 \pm 1,7$ и $24,1 \pm 0,7$ соответственно), что соответствует значениям в группе intactных животных.

Содержание альбумина в плазме крови intactных животных составляло $2,9 \pm 0,09$ г/дл, после развития модели – $0,95 \pm 0,02$ (рис. 5.). По сравнению с КЗС-группой применение КЭП повышало содержание альбумина в плазме крови в 1,8 раза ($2,26 \pm 0,07$ и $1,25 \pm 0,04$ соответственно).

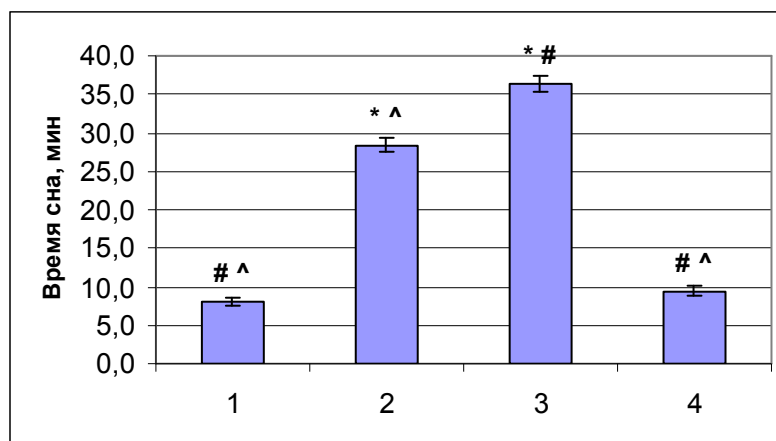


Рис. 3. Изменение продолжительности гексеналового сна животных: 1 – intactные животные, 2 – крысы после формирования АПП, 3 – КЗС, 4 – КЭП.

* - $P < 0,05$ по отношению к intactным животным, # - $P < 0,05$ по отношению к животным после развития АПП, ^ - $P < 0,05$ по отношению к животным, которым вводили КЗС.

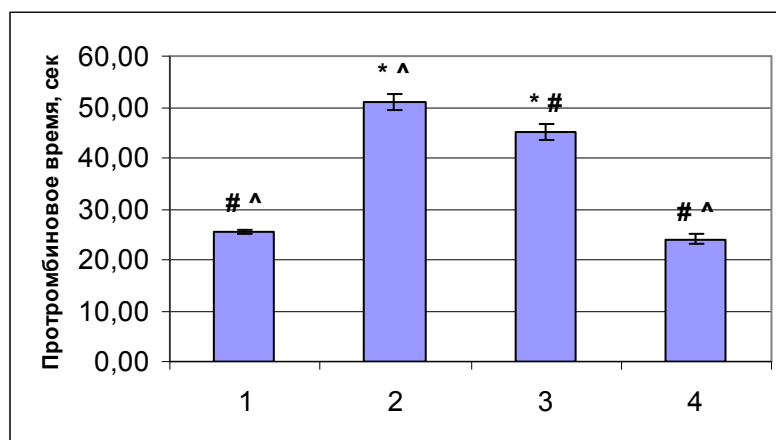


Рис. 4. Изменение протромбинового времени животных: 1 – intactные животные, 2 – крысы после формирования АПП, 3 – КЗС, 4 – КЭП.

* - $P < 0,05$ по отношению к intactным животным, # - $P < 0,05$ по отношению к животным после развития АПП, ^ - $P < 0,05$ по отношению к животным, которым вводили КЗС.

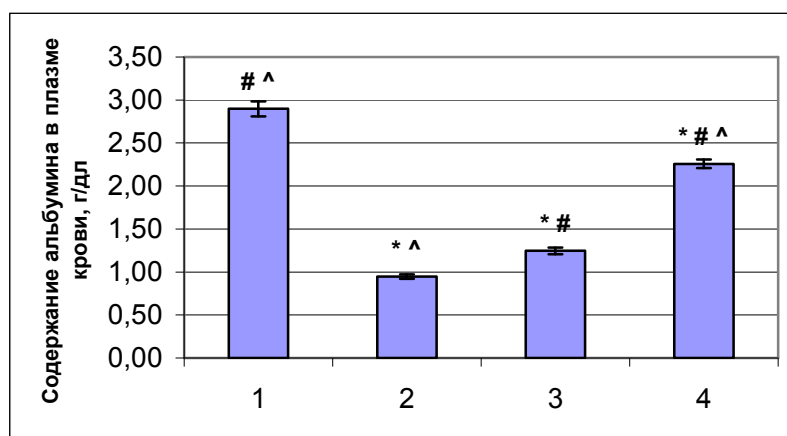


Рис. 5. Изменение содержания альбумина в плазме крови животных: 1 – intactные животные, 2 – крысы после формирования АПП, 3 – КЗС, 4 – КЭП.

* - $P < 0,05$ по отношению к intactным животным, # - $P < 0,05$ по отношению к животным после развития АПП, ^ - $P < 0,05$ по отношению к животным, которым вводили КЗС.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном положительном влиянии КЭП на общее состояние организма и процессы репарации печени.

Способность КЭП активизировать восстановительные процессы в печени на модели АПП выявлена впервые, но, тем не менее, не является неожиданной. Имеются данные о положительном влиянии КЭП на регенерацию печени при частичной гепатэктомии [4]. Улучшение общего состояния, в некоторой степени, может быть связано с повышением функциональной активности печени, которая, как известно, является «главной лабораторией» организма и регулирует разнообразные метаболические процессы. Наши результаты согласуются с данными [5], доказывающими способность криоконсервированных КЭП в значительной степени восстанавливать функции печени при её цирротическом перерождении. Через две недели после трансплантации КЭП в

пульпу селезёнки авторы наблюдали улучшение энергетического состояния печени, снижение уровня билирубина, повышение содержания альбумина в сыворотке крови. Однако может существовать и другой путь – неспецифическое стимулирующее влияние на различные органы, спровоцированные хроническим поступлением этанола в организм, что, в свою очередь, создаёт более благоприятные условия для протекания процессов саногенеза в печени. Известно, что СК внутренних органов существуют не только во время внутриутробного развития, но и в постнатальном периоде. Постнатальные СК регулируют гомеостаз в большинстве органов на протяжении всей жизни организма [17]. Несмотря на отсутствие единого мнения об иерархии СК печени и роли различных претендентов в восстановлении её функций [6, 15], их вклад в регенеративные и репаративные процессы

не вызывает сомнений. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что СК, введенные в организм способны оказывать модулирующее влияние на активность собственных «взрослых» СК. Таким образом, эффект от введения экзогенных СК может быть опосредован постнатальными СК внутренних органов. В пользу такой трактовки свидетельствуют исследования, проведенные нами ранее [7], где на модели хронического отравления алкоголем показано, что внутривенное введение эмбриональных нервных клеток оказывает положительное влияние на общее состояние организма и улучшает функциональное состояние печени. Каковы механизмы указанного влияния и насколько оно тканеспецифично пока не ясно, и требует проведения дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

На основании полученных данных можно утверждать, что внутривенное введение криоконсервированных КЭП человека

крысам с АПП улучшает общее состояние организма и стимулирует процессы репарации печени. Об улучшении общего состояния свидетельствует увеличение прироста массы тела и улучшение состояния шерсти. Стимуляция репаративных процессов проявляется в восстановлении функциональной активности органа, а именно в нормализации продолжительности гексеналового сна и протромбинового времени, повышении содержания альбумина в плазме крови.

Важно, что указанный терапевтический эффект применения КЭП человека в условиях АПП у крыс получен при продолжении приёма этанола, то есть без полной абстиненции.

Результаты настоящего исследования могут выступать в качестве экспериментального обоснования для разработки принципиально новых терапевтических концепций при заболеваниях печени алкогольного генеза, построенных на использовании КЭП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грищенко В. И. // Журн. АМН України. - 2004. - Т. 10. - № 2. - С. 253-258.
2. Ковалёв Г. А., Петренко А.Ю. // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Серія Медицина. - 2004. - № 617. - Вип. 8. - С.14-18.
3. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки. -Черновцы: Золоті литаври. - 2004. - 505 с.
4. Оченашко О.В., Божков А.И., Петренко А.Ю. // Укр. біохім. журн. - 2002. - Т. 74. - № 3. - С. 25-30.
5. Оченашко О.В., Волкова Н.А., Петренко А.Ю. // Проблемы криобиологии. - 2002. - № 3. - С. 87-89.
6. Петренко А. Ю., Грищенко В. И., Оченашко О.В., и др. // Межд. мед. ж. - 2003. - № 3. - С. 121-126.
7. Петренко А.Ю., Ковалёв Г.А., Грищенко В.И. // Пробл. криобиол. - 2005. - Т. 15. - № 1. - С. 71-78.
8. Ben-Hur T., Idelson M., Khaner H., et. al. // Stem Cells. - 2004. - Vol.22. - № 7. - P. 1246-1255.
9. Bongso A., Richards M. // Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. - 2004. - Vol.18. - № 6. - P. 827-842.
10. Carnevale-Schianca F., Ricchiardi A., Capaldi A., et. al. // Transplant Proc. - 2005. - Vol. 37. - № 6. - P. 2664-2666.
11. Di Campi C, Piscaglia A.C, Rutella S., et. al. // Transplant Proc. - 2005. - Vol.37. - № 6. - P. 2707-2710.
12. Douglas A., Jero'nia L., Michael J, et. al. // The Journal of Neuroscience. - 2003. - Vol. 23. - № 12. - P.5131-5140.
13. Hoek J.B. // Hepatology. - 1999. - Vol. 29. - № 5. - P. 1602-1604.
14. Hovatta O., Meri S. // Ann Med. 2005. Vol.37. - № 7. - P. 466-468.
15. Hussain S.Z., Strom S.C., Kirby M.R., et. al. // Dig Dis Sci. - 2005. - Vol. 50. - № 10. - P. 1755-1763.
16. Jantunen E., Luosujarvi R. // Ann Med. - 2005. Vol.37. - № 7. - P.533-541.
17. Kindler V. // J. Leukoc Biol. - 2005. - Vol. 78. - № 4. - P. 836-844.
18. Liew C., Moore H., Ruban L., et. al. // Ann Med. - 2005. - Vol. 37. - №. - P. 7521-7532.
19. Shafritz D.A., Dabeva M. D. // Einstein Quart. J. Biol. Med. - 2002. - № 19. - P. 20-32.
20. Young H., Duplax C, Katz R., et. al. // J Cell Mol Med. - 2005. - № 9. - P. 753-769.

ВНУТРІШНЬОВЕННЕ ВВЕДЕННЯ КЛІТИН ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЩУРАМ З АЛКОГОЛЬНИМ УРАЖЕННЯМ ПЕЧІНКИ

О.Ю. Петренко¹, Г.О. Ковальов²

¹Інститут проблем криобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

²Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Україна

РЕЗЮМЕ

Досліджували дію криоконсервованих клітин ембріональної печінки (КЕП) на моделі алкогольного ураження печінки у щурів. Показано, що внутрішньовенне введення КЭП покращує загальний стан

організму (збільшує приріст маси тіла, покращує стан шерсті) і відновлює функціональний стан печінки (нормалізує тривалість гексеналового сну і протромбінового часу, підвищує вміст альбуміну в плазмі крові). Вказані результати одержані на тлі прийому алкоголю, що продовжується.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ембріональні клітини печінки, кріоконсервування, внутрішньовенне введення, алкогольне ураження печінки, модель, щури

INTRAVENOUS INJECTION OF CELLS OF EMBRYONIC LIVER TO RATS WITH ALCOHOL INDUCED HEPATIC INJURY

A.Yu. Petrenko¹, G.A.Kovalyov²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov.

²V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine

SUMMARY

The action of cryopreserved cells of embryonic liver (CEL) on the model of alcohol induced hepatic injury at rats was explored. It is shown that intravenous injection of CEL improves the organism's general state (enlarges the increase of body weight, improves the hair state) and restores the functional state of liver (normalizes duration of hexenal sleep and prothrombin time, increases albumin content in blood plasm). Indicated results, got on a background of continued alcohol intake.

KEY WORDS: cells of embryonic liver, cryopreservation, intravenous injection, alcohol induced hepatic injury, model, rats